

Válaszok Dr. Prohászka Zoltán opponensi véleményére:

Nagyon köszönöm Prohászka Zoltán professzor úr alapos, részletes bírálatát, előremutató javaslatait és támogató állásfoglalását. A válaszaimat az alábbiakban részletezem:

1, *Az adatok bemutatásával és értékelésével kapcsolatos kérdés:*

Obszervációs klinikai vizsgálatok esetén megalapozott döntéseket (kapcsolatok, predikciók) csak kiegyensúlyozott vizsgálati csoportok adataira alapozva lehet hozni. Amennyiben a vizsgálati csoportok nem kiegyensúlyozottak zavaró- és torzító tényezők szempontjából, adjusztált analízis is célravezető lehet. Munkája során eset-kontroll, eset-eset és kohorsz/kimenet típusú vizsgálatokat is végzett, ilyen összehasonlításokat tartalmaz a doktori mű (SS/SLE/kontroll, SLE/APS+ és SLE/APS-, izületi betegek követése/relapszus), azonban következtetéseit nyers (egy szempontos) összehasonlításokra alapozza minden esetben (van ahol a szórás sincs feltüntetve az átlag mellett, pl. 5. táblázat első sora). Miért nem történt több szempontos (adjusztált) statisztikai analízis? Mit gondol, befolyásolta volna a következtetéseket az ilyen fajta elemzés?

Az eredmények kiértékelése és publikálása során általában statisztikában jártas matematikus segítségét vettem igénybe, illetve a szerzőtársak és a kéziratok bírálói részéről jövő kommentárok, tanácsok alapján is átdolgoztam szükség esetén az analíziseket. Ezen szűrők után, bár biztos vagyok benne, hogy Professzor Úr meglátása helytálló, de úgy vélem, az eredményeket érdemben befolyásoló eltérés nem volt.

2, *A génexpressziós vizsgálatokkal kapcsolatos kérdés:*

A glikozilációs mintázat molekuláris mechanizmusainak vizsgálata során több alkalommal is végzett génexpressziós analízist, azonban a génexpressziós változások elemzését és bemutatását nem egységes módon végezte. Egyes esetekben a referenciaként használt gén expressziójából levonta a vizsgált gén expresszióját (21., 22. ábrák), míg a más esetekben hányadosokat számolt (14., 24. ábrák). Mi volt a különböző számítási mód oka?

A kvantitatív valós-idejű PCR egy háztartási gén kifejeződéséhez hasonlított, így relatív mRNS szint meghatározásával ad információt a vizsgálni kívánt génexpresszióról. A relatív mRNS szint kiszámítási módja az adott gén kiindulási mennyiségét jellemző küszöbérték ciklusszámok (Ct-érték) különbségének meghatározása (ΔC_t számítás), mint az a 3.2.1.4.

és 3.2.2.4. fejezetben leírásra került. A vizsgált génre és a housekeeping génre vonatkozó kitevők különbségét ábrázoljuk, ami a két érték hányadosának felel meg. Ezt a számítást

minden esetben elvégeztük és a 14.A, 21. és 22 A ábrán ezen értékek kerültek ábrázolásra. Abban az esetben, amikor két mintasor közti eltérésre vagy változásra szeretnénk helyezni a hangsúlyt, akkor ezen ΔCt értékekkel további műveleteket végezhetünk, hogy szemléletesebbé tegyük a génexpresszióbeli különbséget. Így a 24 A ábrán az egészségesek és az SLE-s betegek közti eltérést ábrázoltuk, az arbitralis egységek azt mutatják meg, hogy az SLE-s betegek relatív mRNS expressziós értéke hányszorosa a kontrollok átlagának. Ezt fejt ki felette a szövegben: „a TMEM203 molekula....13,83-szoros upregulációt észleltünk a kontrollokhhoz képest”, vagyis a két csoport relatív expressziós rátái átlagának a hányadosa 13,83. A 22. B ábrán pedig azért alkalmaztuk a ΔCt értékek hányadosának (transzformált értékeik kitevőinek a különbségének) ábrázolását, mert azt szeretnénk volna láthatóvá tenni, hogy az ellentétesen ható enzimek (szialil-transzferázok, illetve szialidázok) aránya megváltozik és ezek együttes hatására fog az összegzett szializációs mintázat kialakulni, aminek biológiai jelentőséget tulajdonítunk.

A 21., 22. ábrák esetében rendkívül kis különbségek szerepelnek az ábrákon, van ahol talán csak 1-2 amplifikációs ciklusszám a különbség a mediánok között, ami igen precízen standardizált és ellenőrzött kísérleti körülményeket feltételez. Milyen, az RNS expressziós analízis megbízhatóságával kapcsolatos minőségi kontrollokat építettek be a sorozatban, primer beteganyagon, hosszú idő alatt végzett kísérletek összehasonlíthatóságának érdekében? Előfordult, hogy egyes RNS expressziós eredményeket nem tudtak figyelembe venni minőségi szempontok miatt?

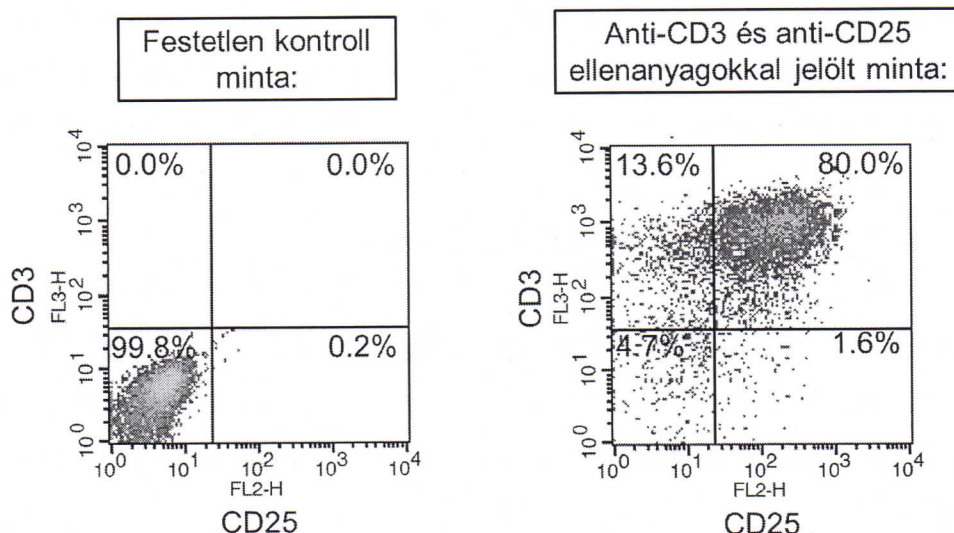
A qPCR méréseket retrospektíven végeztük. Az SLE-s betegek és egészséges kontroll személyek aktivált T-sejt mintáit az RNS-t prezerváló oldatban -80C-fokon tároltuk mindaddig, amíg a teljes anyag össze nem gyűlt. Az RNS tisztítását, cDNS átírását és a qPCR-t egyszerre, egyidőben végeztük az összes mintával éppen annak érdekében, hogy a technikai hibát ne vigyünk bele ebbe az érzékeny módszerbe. Maga a qPCR három párhuzamos méréssel készült és a kísérlet kivitelezésénél követtük a MIQE ajánlását a minőségbiztosítást illetően (1). A legtöbb glikozilációs enzim egyének közti szórása kicsinek bizonyult, ami lehetővé tette, hogy már kis ciklusszám különbség is szignifikáns változást eredményezzen a Bonferroni post hoc analízis után is.

A három párhuzamos mérés közül azt nem vettük figyelembe, ahol az olvadási profil meghatározása nyomán (melt analízis) egyértelmű volt, hogy nem a várt PCR termék keletkezett. Bár ilyen eset ritkán fordult elő és egyik esetben sem érintette mind a három párhuzamos mérést.

3, A T-sejtek izolálásával kapcsolatos kérdés

A T-sejtek izolálását és aktiválását több kísérletnél is alkalmazta, protokollját többször le is írja a dolgozatban. Minden ilyen leírás perifériás mononukleáris sejtek izolálását, 72 órás kultúrában való aktiválását (PHA-nal), majd további tisztítás vagy jelölés nélküli felhasználását mutatja be. Mit gondol, jelen lehetett-e a szortolás- vagy jelölés majd kapuzás nélkül felhasznált sejtpopulációkban olyan szennyezés (pl. B-limfociták, NK sejtek), ami befolyásolhatta génexpressziós vagy lektinkötési eredményeit? Végeztek az ilyen - lehetséges sejtszennyezéssel kapcsolatos - ellenőrzési vagy beállítási kísérleteket?

PHA-val 72 órán át aktivált T-sejteket a lektinkötéses áramlási citometriás és génexpressziós vizsgálatokhoz használtunk. Ugyanannak a betegnek a véreből tisztított perifériás mononukleáris sejteket a 72-órás PHA-aktiválás után szétszöttük a fent említett kísérletekhez. A kultúrában a T-sejtek arányát és aktivált állapotát anti-CD3 illetve anti-CD25 ellenanyag jelöléssel ellenőriztük áramlási citometriával. Az élő sejteken belül a CD3-pozitív sejtek aránya általában minden mintában 90% felett volt és ezeken belül az aktivált CD25-pozitív sejtek aránya 85% felett volt, mint azt az alábbi ábra is szemlélteti, ezért nem végeztünk további tisztítási lépéseket. A további citofluorimetriás vizsgálatokban az aktivált T-sejt populációt CD3+ sejtekre is kapuztuk, így a T-sejteken kívül másféle sejtek nem kerültek be az analízisbe. A molekuláris biológiai vizsgálatoknál nem volt lehetőségünk további tisztításra, mivel az SLE betegek többsége lymphopeniás és a levehető vérmennyiség limitált, így a rendelkezésre álló sejtmennyiség korlátozott volt.



További észrevételek

- *A 66. oldalon mesenchymalis őssejtek felhasználásáról ír, azonban a dolgozatban nem találtam leírást ezen sejtek eredetével kapcsolatban.*

A vad típusú csontvelői mezenchymalis őssejt (BMMSC^{wt}) és a galektin-1 génkiütött (knockout, KO) mezenchymalis őssejt (BMMSC^{gal-1/-}) alapkultúrát Dr. Uher Ferenc (Országos Vérellátó Szolgálat, Őssejtbiológiai Laboratórium) segítségével készítettük. Izolálásuk vad típusú (C57BL/6) illetve Gal-1 génkiütött egerek (B6.Cg-Lgals1^{tm1Rob/J} Gal-1^{-/-}) femurjainak és tíbiáinak velőüregéből történt Peister és mtsai. által leírt módon (2). MSC mivoltuk bizonyításához zsír- és csontszövet irányba differenciáltattuk őket, illetve megvizsgáltuk, hogy hordozzák-e a CD44, CD73, CD90 és Sca-1 MSC markereket (3).

- *A 16. ábra "A" panelje a galektin-1 fehérje expresszióját mutatja be Western-blot analízissel. A képen kivágott gél darabokat látunk molekuláris markerek nélkül. Ez a fajta bemutatás nem méltó egy doktori dolgozathoz.*

Az adott ábrázolási módot azért fogadták el a közleményünkben (4), mivel a kísérletben alkalmazott behatóan jellemzett ellenanyagok nem adnak háttérrel és aspecifikus reakciót Western blottingban. A kísérletben természetesen használtunk molekulásúly markert, melyet transzferáltunk a blotting mátrixra. A marker segítségével meg is határoztuk a csíkok molekulásúlyát, amely egyezett a Gal-1 (16kDa) és a felviteli kontrollként használt aktin (42kDa) molekulásúlyával. A gélből nem vágunk ki, vagy le darabot, az egészet transzferáltuk a blotting mátrixra, de valóban a teljes membránképből a publikációban kihagytuk a molekulásúly markereket, szándékunk szerint a csíkok kiemelése érdekében.

Felhasznált irodalom

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments Clinical Chemistry 2009; 55(4):611-22.

2. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004; 103(5): 1662-1668.
3. Szebeni GJ, Kriston-Pál E, Blazsó P, Katona RL, Novák J, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Hegyi B, Uher F, Krenács L., Joó G, Monostori É. Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. *PLoS One* 2012; 7: e41372.
4. Deák M, Hornung Á, Novák J, Demydenko D, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Monostori É, Kovács L. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology*. 2015; 220(4):483-9.

Szeged, 2021. július 22.



Dr. Kovács László

